

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-120273

(43)Date of publication of application : 08.05.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12N 9/06  
C12Q 1/26  
//(C12N 15/09  
C12R 1:06 )

(21)Application number : 11-301386

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 22.10.1999

(72)Inventor : NISHIYA YOSHIKI  
KAWAMURA YOSHIHISA

### (54) METHOD FOR MODIFYING PROTEIN AND MODIFIED PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a modified protein (e.g. modified sarcosine oxidase) which allows simply assaying flavinadeninedinucleotide.

SOLUTION: This is a method for modifying a protein (e.g. sarcosine oxidase) by deleting, substituting, or adding one amino acid or more from, in, or to an amino acid sequence constituting a protein, particularly modifying an amino acid residue covalently binding to flavin in the amino acid sequence of the protein so that the activity expression can depend on the concentration of flavinadeninedinucleotide.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-120273

(P2001-120273A)

(43) 公開日 平成13年5月8日 (2001.5.8)

(51) Int. CL <sup>7</sup>	識別記号	FI	テームド <sup>*</sup> (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 9/06	B 4B024
9/06		C12Q 1/26	4B050
C12Q 1/26		C12R 1:06	4B063
# (C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA
C12R 1:06)		C12R 1:06)	
審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 11 頁)			

(21) 出願番号 特願平11-301386

(22) 出願日 平成11年10月22日 (1999. 10. 22)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 西矢 芳昭

福井県敦賀市東浜町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川村 良久

福井県敦賀市東浜町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の改変方法および改変タンパク質

(57) 【要約】

【課題】フラビンアデニンヌクレオチドの簡便な測定を実現できるような改変タンパク質、例えば改変サルコシンオキシダーゼを提供することを目的とする。

【解決手段】タンパク質を構成するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加せしめることによるタンパク質の改変方法であって、該タンパク質のアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンヌクレオチド濃度に依存的事を特徴とするタンパク質、例えばサルコシンオキシダーゼの改変方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 タンパク質を構成するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加せしめることによるタンパク質の改変方法であって、該タンパク質のアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするタンパク質の改変方法。

【請求項2】 タンパク質がサルコシンオキシダーゼである請求項1記載のタンパク質の改変方法。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、サルコシンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質。

【請求項4】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する請求項3記載の改変タンパク質。

【請求項5】 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する請求項3記載の改変タンパク質。

【請求項6】 請求項3～5のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培養物から改変タンパク質を採取することを特徴とする改変タンパク質の製造方法。

【請求項7】 請求項3～5のいずれかに記載の改変タンパク質を基質に作用せしめることにより生じる物質を直接あるいは間接的に測定することを特徴とするフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)濃度に依存的である改変タンパク質、すなわちフラビンタンパク質のフラビンと共有結合するアミノ酸残基をタンパク質工学的な手法により改変した、フラビンアデニンジヌクレオチドの測定に用いることのできる活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改変タンパク質、該改変タンパク質の製造方法、および該改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】フラビンアデニンジヌクレオチドは、フラビン縮合素の一種であり、リボフラビン(ビタミンB<sub>2</sub>)の縮合型の一つである。フラビン縮合素の多くはフラビンアデニンジヌクレオチドを縮合素としており、糖、アミノ酸、脂肪酸の中間代謝、酸化的リン酸化などの生体内の酸化還元反応において広範囲にわたって重要

な働きをしている。通常は、フラビン縮合素とは高い親和性で非共有結合しているが、一部の縮合素はヒスチジン残基またはシステイン残基で共有結合している。この様に、生体内で重要な働きをするフラビンアデニンジヌクレオチドであるが、簡便な測定法は無く、リボフラビンとして比色法、蛍光法、ルミフラビン蛍光法により測ることしかできなかった。従って、フラビンアデニンジヌクレオチドの簡便な測定系が望まれている。

## 【0003】

10 【発明が解決しようとする課題】本発明は、主として、フラビンアデニンジヌクレオチドの簡便な測定を実現できるような改変タンパク質、例えば、改変サルコシンオキシダーゼを提供することを目的とするものである。

【0004】上記課題を解決するための最も適切な方法は、フラビンアデニンジヌクレオチドを縮合素とする酵素タンパク質がアボ化されたもの、すなわちフラビンアデニンジヌクレオチドが結合していないものを得て、フラビンアデニンジヌクレオチドに対する依存性を利用して測定する方法である。しかしながら、フラビン縮合素との親和性は、解離定数が1~10nMと非常に高く、アボ化タンパク質を調製することは困難である。また、無理にフラビンアデニンジヌクレオチドを解離させようすると、機能の損失につながる恐れが大きい。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために、種々検討した結果、フラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的であることを特徴とする改変タンパク質を達成することが可能であることを見出した。さらに、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である該改変タンパク質を利用して、フラビンアデニンジヌクレオチドの測定を簡便に行うことが可能であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0006】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) タンパク質を構成するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加せしめることによるタンパク質の改変方法であって、該タンパク質のアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を改変することにより、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするタンパク質の改変方法。

(2) タンパク質がサルコシンオキシダーゼである

(1)のタンパク質の改変方法。

(3) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、サルコシンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質。

(4) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の

第318番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有する(3)の改変タンパク質。

(5) 配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列を有する(3)の改変タンパク質。

(6) (3)~(5)のいずれかのアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、培養物から改変タンパク質を採取することを特徴とする改変タンパク質の製造方法。

(7) (3)~(5)のいずれかの改変タンパク質を基質に作用せしめることにより生じる物質を直接あるいは間接的に測定することを特徴とするフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明のタンパク質の改変方法は、該タンパク質を構成するアミノ酸配列においてフラビンと共有結合するアミノ酸残基を、タンパク質工学的手法を用いることにより改変することにより、該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸を欠失、置換若しくは付加せしめ、それによって、該タンパク質の活性発現をフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的とすることを特徴とするものである。ここで、フラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的であるということは、タンパク質の触媒活性が系に存在するフラビンアデニンジヌクレオチドの濃度が高いほど高まることをいうものである。

【0008】本発明により改変されうるタンパク質としては、フラビンタンパク質のフラビンと共有結合するものであれば対象となりうるものであり、特に限定されるものではない。具体的には例えば、サルコシンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、メチルアミノ酸オキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどが挙げられる。

【0009】本発明の一実施態様として、フラビンアデニンジヌクレオチドを補酵素とする酸化酵素であるサルコシンオキシダーゼの改変を一例として説明する。なお、本発明は、サルコシンオキシダーゼの改変に特に限定されるものではない。

【0010】従来から、サルコシンオキシダーゼ(EC 1.5.3.1)は、臨床的に筋疾患、腎疾患の診断の指標となっている体液中のクレアチン、クレアチニンの測定用酵素として、他の酵素、例えばクレアチナーゼ、クレアチナーゼ、ペルオキシダーゼと共に使用されている。サルコシンオキシダーゼは基質であるサルコシンに水、酸素の存在下で作用して、グリシン、ホルムアルデヒドおよび過酸化水素を生成する。

【0011】このようなサルコシンオキシダーゼは、バチルス(Bacillus)属(特開昭54-52789号公報)、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属(Journal of Biochemistry 89, 599 (1981))、シリンドロ

カルボン(Clyndrocarpon)属(特開昭56-92790号公報)、シュードモナス(Pseudomonas)属(特開昭60-43379号公報)等の細菌が生産することが知られている。とりわけ、アースロバクター・エスピー(Arthrobacter sp.) TE1826(微工研菌寄第10637号)の生産するサルコシンオキシダーゼは、従来のサルコシンオキシダーゼよりも熱安定性に優れ、かつKm値の小さい実用的な酵素であることが既に知られている(特開平2-265478号公報)。これらのサルコシンオキシダーゼは、システイン残基でフラビンアデニンジヌクレオチドと共有結合していることが既に解明されている(Structure 7, 331 (1999))。

【0012】本発明者らは、既にアースロバクター・エスピーTE1826より抽出した染色体DNAよりサルコシンオキシダーゼ遺伝子の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定し(Journal of Fermentation and Biotechnology 75, 239 (1993))、本サルコシンオキシダーゼを遺伝子工学的手法によって形質転換体に高生産させることに成功し、高純度のサルコシンオキシダーゼを安価に大量供給することを可能にしている(特開平6-113840号公報)。

【0013】本発明において、改変される前のサルコシンオキシダーゼとしては、特に限定されないが、例えば、バチルス属由来のサルコシンオキシダーゼ、シュードモナス属由来のサルコシンオキシダーゼなどが挙げられる。なかでも、アースロバクター・エスピーTE1826(微工研菌寄第10637号)のサルコシンオキシダーゼ(特開平2-265478号公報、特開平6-113840号公報、Journal of Fermentation and Biotechnology 75, 239 (1993))を用いるのが好ましい。アースロバクター・エスピーTE1826由来のサルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列は配列表の配列番号1に示す通りである。該サルコシンオキシダーゼのアミノ酸配列中、第318番目のシステイン残基がフラビンアデニンジヌクレオチドとの共有結合に関与する部位として同定されている。

【0014】本発明における、改変されたサルコシンオキシダーゼとしては、例えば、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸からなり、サルコシンオキシダーゼ活性を有する改変タンパク質が挙げられる。特に、配列表の配列番号1に記載されるアミノ酸配列の第318番目のシステインが他のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有することが好ましく、該第318番目のシステインがセリンに置換されたアミノ酸配列を有することが、さらに好ましい。

【0015】本発明の改変タンパク質の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変す

る手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット(Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製、EX-DIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製、QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など)の使用、或いはポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR)の利用が挙げられる。

【0016】作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリイ(Escherichia coli)を宿主微生物とする場合にはpBluescript、pUC18などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリイ W31.10、エシェリヒア・コリイ C600、エシェリヒア・コリイ JM109、エシェリヒア・コリイ DH5 $\alpha$ などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコムピテントセル(例えば、コムピテントハイ JM109; 東洋紡績製)を用いても良い。

【0017】こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、ショクロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、饴糖、ビリン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。培養温度は菌が発育し、改変蛋白質を生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリイの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変タンパク質が最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育し改変タンパク質を生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH 6.0

~9.0程度である。

【0018】培養物中の改変タンパク質を生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従って改変タンパク質が培養液中に存在する場合は、遠心分離などにより、改変タンパク質含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変タンパク質が菌体内に存在する場合には、得られた培養物から遠心分離などの手段により菌体を取り出し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加して改変タンパク質を可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0019】この様にして得られた改変タンパク質含有溶液を、例えば、減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製された改変タンパク質を得ることができる。

【0020】上記改変タンパク質を用いたフラビンアデニンヌクレオチドの測定方法としては、該改変タンパク質の反応により生じる物質を直接或いは間接的に測定する方法であれば、如何なる方法も利用することができる。例えば、改変タンパク質が改変サルコシンオキシダーゼである場合、サルコシンオキシダーゼの酵素反応により生じる過酸化水素に対し、ペルオキシダーゼの作用によりキノン色素を生成させ、その発色量より定量する方法、酵素反応により生じるホルムアルデヒドにホルムアルデヒド脱水素酵素を作用させ、生成するNADHを紫外部の吸光度により測定する方法などが挙げられる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により、具体的に説明する。なお、実施例中、オキシダーゼ活性の測定は以下のようにして行なった。すなわち、50mM トリス-HCl緩衝液(pH 8.0)、95mMの基質(サルコシン)、0.47mM 4-アミノアンチピリン、2.0mMフェノール、4.5U/mlペルオキシダーゼ中で酵素を37℃、10分反応させ、500nmにおける吸光度を測定した。

【0022】実施例1 サルコシンオキシダーゼの改変サルコシンオキシダーゼの遺伝情報を有する組換え体プラスミドpSACEP3をJournal of Fermentation and Bioengineering 75, 239 (1993)に記載の方法に従い、以下に示す様に調製した。アースロバクター・エスピーTE1826の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100mlの2×YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH 7.0

2) )で37℃で一晩振盪培養後、遠心(8000 rpm, 10分)により集菌した。15mMクエン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュクロース、1mM EDTA、50mM トリス-塩酸(pH7.6)を含んだ溶液5mlに懸濁させ、0.5mlのリゾチーム溶液(100mg/ml)を加えて37℃、30分間保温した。次いで、11mlの1% ラウロイルサルコシニド、0.1M EDTA (pH9.6)を含む溶液を加えた。この懸濁液に臭化エチジウム溶液を0.5%、塩化セシウムを約100%加えて攪拌混合し、55000 rpm, 20時間の超遠心でDNAを分取した。分取したDNAは、10mM トリス-塩酸(pH8.0)、1mM EDTAを含んだ溶液(TE)で透析し、精製DNA標品とした。

【0023】上記精製DNA標品1μgを制限酵素 Sau3AI(東洋紡績製)で部分分解反応させ、2 kbp以上の断片に分解した後、SalI(東洋紡績製)で切断したpUC18(0.5μgと、M.G.LoftusらのBACKFILLING法(Biotec techniques Vol12, No.2(1992))に従い、T4 DNAリガーゼ(東洋紡績製)1ユニットで16℃、12時間反応させDNAを連結した。連結されたDNAはHanahanの方法により作成したエシェリヒア コリイJM109のコンピテントセルを用いて形質転換した。使用したDNA1μg当たり約1×10<sup>6</sup>個の形質転換体のコロニーが得られた。得られたコロニーは50μg/mlアンピシリン、0.5%サルコシニド、0.005%パラオースアニリン、及び0.025%ソディウムヒドロキシナルファイト入り培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)で37℃、18時間培養し、赤色コロニーを指標にサルコシニドオキシダーゼ遺伝子の導入された組換えDNAをスクリーニングした。

【0024】その結果、約1000個のコロニーのうち1株の割合で赤色を示すコロニーを得た。この中の1株が保有するプラスミドには約8.7 kbpの挿入DNA断片が存在しており、このプラスミドをpSAQ1とした。次いでpSAQ1より挿入DNA断片を種々の制限酵素により切断してpUC18にサブクローニングし、約1.7 kbpの挿入DNA断片を有するpSACEP3を得た。配列表の配列番号1にpSACEP3の挿入DNA断片中にコードされているサルコシニドオキシダーゼのアミノ酸配列を記載している。

【0025】本組換えプラスミドpSACEP3を基に、配列表の配列番号3のオリゴヌクレオチドとDNA中の塩基を交換するキットであるTransformer Mutagenesis Kit(Clonetech製)を用い、メーカーのプロトコルに従い変異処理操作を行った。その結果、配列表の配列番号1記載の第318番目のシステインがセリンに置換された改変タンパク質C318Sの遺伝情報を有するDNA

を保持するプラスミドを作製することができた。C318Sの遺伝情報を有するDNAを種々の制限酵素で切断してサブクローンを調製し、常法に従いSEQUENCING PRO 7-deaza-dGTP kit(東洋紡績製)を用いて塩基配列を決定し、改変されていることを確認した。

【0026】C318Sはフラビンアデニンヌクレオチドと共有結合できないため、サルコシニドオキシダーゼ活性は検出限界以下であった。そこで、精製を容易にするため、C318Sのカルボキシ末端にヒスチジン残基が6個付加されるように遺伝子を改変した。具体的には、配列表の配列番号4および配列番号5のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、pSACEP3を鋳型として、KOD DNA polymerase(東洋紡績製)を用いてPCRを実施した。得られたサルコシニドオキシダーゼ遺伝子をPstIとEcoRIで処理し、pUC18のPstI、EcoRI消化物とライゲーションした。この操作で作成されたプラスミドpC318S-HTは、C318Sのカルボキシ末端にヒスチジン残基が6個付加された変異サルコシニドオキシダーゼC318S-HTをコードしている。図1にその概略を示す。

【0027】C318S-HTの遺伝情報を有するDNAを種々の制限酵素で切断してサブクローンを調製し、常法に従いSEQUENCING PRO 7-deaza-dGTP kit(東洋紡績製)を用いて塩基配列を決定し、改変されていることを確認した。組換え体プラスミドpC318S-HTでエシェリヒア コリイJM109のコンピテントセルを形質転換し、形質転換体を得た。

【0028】実施例2 形質転換体の培養と改変タンパク質の精製

2×YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))50mlを500mlフラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行い放冷後、別途無菌濾過した50mg/mlアンピシリン(ナカライテスク製)を0.1%添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め37℃で18時間振盪培養した形質転換体の培養液1mlを接種し、37℃で通気攪拌培養した。培養液より改変タンパク質を、ヒスチジン残基が末端に6個付加されたタンパク質を特異的に精製できるMachExtractor-His-tag-タンパク質精製キット(東洋紡績製)を用いて、SDS-PAGEにて単一のバンドを形成するまで精製した。

【0029】実施例3 改変タンパク質の評価  
精製された改変タンパク質C318S-HTを用いた、フラビンアデニンヌクレオチド測定結果を図2に示す。測定は、サンプル(フラビンアデニンヌクレオチド水溶液)10μlと試薬(50mM トリス-HCl緩衝液(pH8.0)、95mM サルコシニド、0.47mM 4-アミノアンチピリン、2.0mM フェノール、4.5U/mlペルオキシダーゼ)290μlを混合し、37℃で2分間インキュベーション後、酵素溶

液(C318S-HT;約0.4mg(E280)/ml)15 $\mu$ lと揮水20 $\mu$ lを加えて混合し、500nmにおける吸光度の増加をみることにより行った。図2から明らかなように、測定値はフラビンアデニンジヌクレオチドに対し濃度依存的であった。すなわち、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定法を確立することができた。

## 【0030】

【発明の効果】上述したように、本発明によりタンパク質をタンパク質工学的手法を用いて改変し、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改

\*変タンパク質を供給することが可能となった。すなわち、フラビンタンパク質のフラビンと共有結合するアミノ酸残基をタンパク質工学的手法により改変し、フラビンアデニンジヌクレオチドの測定に用いることのできる、活性発現がフラビンアデニンジヌクレオチド濃度に依存的である改変タンパク質、該改変タンパク質の製造方法、および該改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定方法が確立された。本発明の改変タンパク質は、細菌の系での遺伝子操作技術による大量生産を實施することができる。

## 【0031】

## 【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 389

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

起源

生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.)

株名: TE1826

配列

```

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser
1           5           10           15
Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr
20           25           30
Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His
35           40           45
Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr
50           55           60
Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys
65           70           75           80
Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly
85           90           95
Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys
100          105          110
Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys
115          120          125
Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu
130          135          140
Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg
145          150          155          160
Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val
165          170          175
Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr
180          185          190
Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn
195          200          205
Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr
210          215          220
Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn

```



(7)

特開2001-120273

11

12

225                      230                      235                      240  
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr  
                          245                      250                      255  
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His  
                          260                      265                      270  
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly  
                          275                      280                      285  
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr  
                          290                      295                      300  
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Cys Met Tyr  
 305                      310                      315                      320  
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe  
                          325                      330                      335  
 Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe  
                          340                      345                      350  
 Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys  
                          355                      360                      365  
 Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys  
                          370                      375                      380  
 Gln Lys Glu Thr Ile  
 385

[0032]

配列番号: 2

配列の長さ: 1670

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: アースロバクター・エスピー (Arthrobacter sp.)

株名: TE1826

配列

CTGCAGTTCT TCTCCAGCT TTGGAATCCT CACCGTAACA TAAGATTGAA CATAATTTAA 6

9

ACTTTTGGCC GCCTTTGAAA CCGTCCGATA TTCAACTACC TTTTGAAAA TCTGAAATC 120

TTTAATTTCC AAGTATAATC ACTCCCAAAA CGTCTTTTCTA CTACTAGCAC TAGAATATTT 180

CTAAAAGTCA TAGCTGCTAT CACTTTTAAG CATTTTACAT CATGCCAAT AGCCCGTATG 240

ATGTAAATAG ATAATTAAGA AAATTCAAAT TACCTGTTTG AAAAAGGAGA GGAAACA 297

ATG AGT ATT AAA AAA GAT TAT GAT GTA ATT GTG GTT GGC GCT GGT TCC 345

Met Ser Ile Lys Lys Asp Tyr Asp Val Ile Val Val Gly Ala Gly Ser

1                      5                      10                      15

ATG GCA ATG GCA GCT GGG TAC TAT CTG TCT AAA CAA GGT GTT AAA ACA 393

Met Gly Met Ala Ala Gly Tyr Tyr Leu Ser Lys Gln Gly Val Lys Thr

20                      25                      30

CTA TTG GTA GAT TCA TTT CAT GCT GGC CAT ACA AAT GGC AGC CAT CAT 441

Leu Leu Val Asp Ser Phe His Pro Pro His Thr Asn Gly Ser His His

35                      40                      45

GGC GAT ACA CGG ATC ATT CGT CAC GCA TAT GGC GAA GGA ACA GAG TAT 489

Gly Asp Thr Arg Ile Ile Arg His Ala Tyr Gly Glu Gly Arg Glu Tyr

50                      55                      60

13  
 GTA CCG TTT GCC TTG AGA GCA CAA GAG TTA TGG TAT GAA TTA GAA AAG 537  
 Val Pro Phe Ala Leu Arg Ala Gln Glu Leu Trp Tyr Glu Leu Glu Lys  
 65 70 75 80  
 GAG ACT CAT CAT AAA ATA TTT ACA AAA ACA GGT GTA CTC GTT TTT GGT 585  
 Glu Thr His His Lys Ile Phe Thr Lys Thr Gly Val Leu Val Phe Gly  
 85 90 95  
 CCT AAA GCA GAA GCT CCT TTC GTT GCC GAA ACA ATG GAA GCC GCA AAG 633  
 Pro Lys Gly Glu Ala Pro Phe Val Ala Glu Thr Met Glu Ala Ala Lys  
 100 105 110  
 GAA CAT TCA TTA GAT GTT GAT TTA CTA GAA GCA AGT GAA ATA AAT AAG 681  
 Glu His Ser Leu Asp Val Asp Leu Leu Glu Gly Ser Glu Ile Asn Lys  
 115 120 125  
 CGT TGG CCA GGT GTA ACG GTT CCT GAG AAT TAT AAT CCT ATT TTT GAA 729  
 Arg Trp Pro Gly Val Thr Val Pro Glu Asn Tyr Asn Ala Ile Phe Glu  
 130 135 140  
 AAA AAT TCT GGT GTC TTA TTT AGT GAA AAT TGT ATT GCC GCT TAC CGT 777  
 Lys Asn Ser Gly Val Leu Phe Ser Glu Asn Cys Ile Arg Ala Tyr Arg  
 145 150 155 160  
 GAA TTG CCG GAA GCA AAT GGT CCG AAA GTT CTA ACG TAC ACA CCC GTT 825  
 Glu Leu Ala Glu Ala Asn Gly Ala Lys Val Leu Thr Tyr Thr Pro Val  
 165 170 175  
 GAA GAT TTC GAG ATT GCC GAG GAC TTC GTC AAA ATC CAA ACC GCC TAT 873  
 Glu Asp Phe Glu Ile Ala Glu Asp Phe Val Lys Ile Gln Thr Ala Tyr  
 180 185 190  
 GGC TCC TTT ACA GCC AGT AAA TTA ATT GTT AGC ATG GCC GCT TGG AAT 921  
 Gly Ser Phe Thr Ala Ser Lys Leu Ile Val Ser Met Gly Ala Trp Asn  
 195 200 205  
 AGC AAA CTG CTA TCA AAA TTA AAT ATT GAA ATC CCA TTG CAG CCA TAC 969  
 Ser Lys Leu Leu Ser Lys Leu Asn Ile Glu Ile Pro Leu Gln Pro Tyr  
 210 215 220  
 CGT CAA GTT GTC GGA TTC TTC GAA TGT GAT GAA AAA AAA TAT AGC AAT 1017  
 Arg Gln Val Val Gly Phe Phe Glu Cys Asp Glu Lys Lys Tyr Ser Asn  
 225 230 235 240  
 ACA CAT GGT TAT CCG GCG TTC ATG GTC GAA GTC CCA ACT GCC ATC TAT 1065  
 Thr His Gly Tyr Pro Ala Phe Met Val Glu Val Pro Thr Gly Ile Tyr  
 245 250 255  
 TAC GGA TTT CCA ACC TTC GCG GCC TGC GCG TTG AAA ATA GCC TAT CAT 1113  
 Tyr Gly Phe Pro Ser Phe Gly Gly Cys Gly Leu Lys Ile Gly Tyr His  
 260 265 270  
 ACG TAT GGT CAA AAA ATC GAT CCA GAT ACG ATT AAT GGT GAA TTT GGT 1161  
 Thr Tyr Gly Gln Lys Ile Asp Pro Asp Thr Ile Asn Arg Glu Phe Gly  
 275 280 285  
 ATT TAC CCG GAG GAT GAA GCG AAT ATT CCG AAA TTC CTG GAA ACA TAT 1209  
 Ile Tyr Pro Glu Asp Glu Gly Asn Ile Arg Lys Phe Leu Glu Thr Tyr  
 290 295 300  
 ATG CCG GCA CCA ACC GCG GAA TTA AAA AGT CCG GCA GTT NNN ATG TAC 1257  
 Met Pro Gly Ala Thr Gly Glu Leu Lys Ser Gly Ala Val Xaa Met Tyr  
 305 310 315 320  
 ACA AAA ACA CCT GAT GAG CAT TTC GTG ATT GAT TTA CAT CCT CAA TTC 1305  
 Thr Lys Thr Pro Asp Glu His Phe Val Ile Asp Leu His Pro Gln Phe

(9)

特開2001-120273

15 16

325 330 335

TGG AAT GTC GCG ATT GCA GCC GGA TTC TCC GGA CAT GCG TTT AAA TTC 1353

Ser Asn Val Ala Ile Ala Ala Gly Phe Ser Gly His Gly Phe Lys Phe

340 345 350

TCA AGC GTA GTT GGT GAA ACA TTA AGT CAA TTA GCT GTA ACC GGT AAA 1401

Ser Ser Val Val Gly Glu Thr Leu Ser Gln Leu Ala Val Thr Gly Lys

355 360 365

ACA GAA CAC GAT ATT TCC ATC TTT TCA ATC AAT GCG CCT GCT TTA AAA 1449

Thr Glu His Asp Ile Ser Ile Phe Ser Ile Asn Arg Pro Ala Leu Lys

370 375 380

CAA AAA CAA AGG ATT TAAAAACGCA AGCAAGCGT ACATAAATTT CGATAGATAT 1504

Gln Lys Glu Thr Ile

385

TATGTACGGC TTACTTTATT TACAACTTAA AAATCTGCAT ATCAATCCTG TCCCTCTACT 1564

GATTGAAGCA CAAACTGTAC TTGAACGGCT TTTTATTAA CTGTAAACGA TAACAGGAAC 1624

GCTAAATAA GAAGACCGCT GCATAAGAAT AGTACGGGAG GAATTC 1679

【0033】

配列番号: 3

配列の長さ: 30

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

AAAAGTCGGC CAGTTAGCAT GTACACAAAA 30

【0034】

配列番号: 4

配列の長さ: 67

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

CCTGCTTTAA AACAAAAAGA AACGATTAGA TCTAGAGGAT CGCATCACCA TCACCATCAC 60

TGAATTC 67

【0035】

配列番号: 5

配列の長さ: 49

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 合成DNA

配列

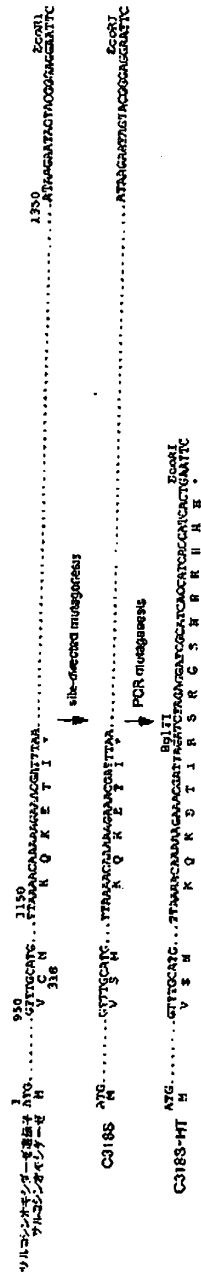
CGCCAGGGTT TTCCAGTCA CGAC 24

【図面の簡単な説明】

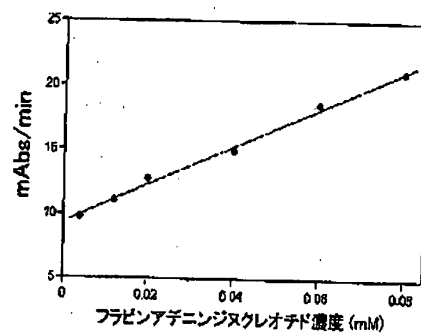
【図1】C318S及びC318S-HTの一次構造の概略を示す図である。

【図2】改変タンパク質を用いたフラビンアデニンジヌクレオチドの測定結果を示す図である。

[ 図 1 ]



【図2】




---

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA08 CA03 CA07  
 CA20 DA06 EA04 GA11 GA19  
 GA25 GA27 GA39 HA01 HA03  
 HA11  
 4B050 CC01 CC04 CC05 DD02 EE01  
 FF03E FF13E FF14E LL03  
 LL05  
 4B063 QA01 QG52 QR03 QR49 QG38  
 QX01